

國立臺灣大學生命科學院生命科學系

學士班學生論文

Department of Life Science

College of Life Science

National Taiwan University

Bachelor's Thesis



培養過程中提升藍綠菌相對豐度的處理方法

Identifying treatments that increase the relative

abundance of cyanobacteria during enrichment

黃榆婷

Yu Ting Huang

指導教授：何銘洋 副教授

Advisor: Ming-Yang Ho, Associate Professor

中華民國 113 年 4 月

April 2024

國立臺灣大學學士班學生論文 口試委員會審定書

培養過程中提升藍綠菌相對豐度的處理方法
Identifying treatments that increase the relative
abundance of cyanobacteria during enrichment

本論文係黃榆婷君 (B09B01041) 在國立臺灣大學生命科學
學系完成之學士班學生論文，於民國 113 年 4 月 22 日承下
列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員(3 位)：

何佩洋 (簽名)(指導教授)

朱修安

蕭友晉

系主任：

鄭昭生 (簽名)

(是否須簽章依各院系規定)

摘要

藍綠菌和植物及藻類相同，能利用可見光 (波長:400-700nm)行光合作用，但有一部分特殊的藍綠菌除了能夠利用可見光之外也能利用能量更低的遠紅光 (波長:700-800 nm)行光合作用。純化這些藍綠菌可以使用遠紅光培養，但藍綠菌在低能量的遠紅光下生長緩慢，因此加速純化過程對後續的研究至關重要。

本研究利用 16S rDNA 定序了解不同處理下的菌相變化，計算相對豐度，若能增加樣本中藍綠菌相對豐度，則能使藍綠菌菌落在固體培養基上的數量上升，提高後續純化成功的機率，加速純化過程。因此，我於實驗中測試以不同條件培養環境樣本，分析何種處理能夠使藍綠菌數量增加。首先使用藍綠菌模式菌株 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn 6803)與可利用遠紅光的藍綠菌株 *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 (Cf 9212)進行抗生素濃度及培養液 pH 值培養條件測試，參考培養條件測試結果設定後續實驗的抗生素濃度及培養液 pH 值。後續實驗包含抗生素處理 Imipenem 5、50 µg/ml 及 Novobiocin 10 µg/ml、pH10 處理、培養液濃度稀釋 2 倍及 4 倍。最後使用 16S rDNA V3-V4 片段定序分析菌相組成，分析結果後發現使用抗生素 Novobiocin 10 µg/ml 處理後整體藍綠菌相對豐度增加最多，且對遠紅光藍綠菌菌相組成影響最小，對藍綠菌及遠紅光藍綠菌以外的細菌如: *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Chloroflexi* 及 *Planctomycetota* 相對豐度有降低的效果，在提高遠紅光藍綠菌相對豐度的同時抑制其他細菌的相對豐度。

此結果可以為未來遠紅光藍綠菌純化方法提供更多元的參考。此外，實驗分析包含所有藍綠菌，對於一般藍綠菌的純化工作也有幫助。

關鍵詞：藍綠菌、遠紅光藍綠菌、Novobiocin

目次



口試委員會審定書.....	i
摘要.....	ii
目次.....	iii
圖次.....	v
表次.....	vii
第 1 章 介紹.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 文獻探討.....	2
第 2 章 材料方法.....	4
2.1 培養條件測試.....	4
2.2 環境採樣.....	5
2.3 培養條件.....	5
2.4 DNA 萃取、16S rDNA V3-V4 片段定序.....	5
2.5 定序資料分析.....	6
第 3 章 結果.....	7
3.1 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 及 <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212 在 Imipenem、Novobiocin 以及 pH10 環境中皆可正常生長.....	7
3.2 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS)分群作圖中顯示	

不同處理之間以及培養前後存在差異	8
3.3 Novobiocin 10 µg/ml 及 Imipenem 50 µg/ml 培養後提升最多藍 綠菌相對豐度	12
3.4 培養後的藍綠菌組成比例與環境樣本存在差異	13
3.5 Novobiocin 10 µg/ml 培養後提升較多遠紅光藍綠菌相對豐度	14
3.6 培養後遠紅光藍綠菌組成比例與環境相似	15
3.7 其他細菌培養前後的相對豐度趨勢不一致	16
3.8 培養後的菌相組成在比例上與環境有些微差異但菌種的組成 並無太大改變	17
第 4 章 討論	19
4.1 提升藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度的處理探討	19
4.2 降低其他細菌相對豐度的處理探討	19
4.3 提升最多藍綠菌與遠紅光藍綠菌的處理如何影響其他細菌	20
4.4 結論	21
4.5 未來研究方向	21
參考資料	22

圖次



圖一、台大校園內採樣點 NTU06、NTU10、NTU14 的遠紅光藍綠菌 菌相組成.....	2
圖二、採樣環境.....	2
圖三、採集樣點位置.....	5
圖四、 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 抗生素濃度培養測試.....	7
圖五、 <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212 抗生素濃度培養測試.....	8
圖六、 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 及 <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212 pH 值培養測試.....	8
圖七、NTU06 全菌相 NMDS 作圖.....	9
圖八、NTU10 全菌相 NMDS 作圖.....	9
圖九、NTU14 全菌相 NMDS 作圖.....	10
圖十、NTU14 培養後樣本全菌相 NMDS 作圖.....	10
圖十一、NTU06 藍綠菌 NMDS 作圖.....	11
圖十二、NTU10 藍綠菌 NMDS 作圖.....	11
圖十三、NTU14 藍綠菌 NMDS 作圖.....	12
圖十四、藍綠菌相對豐度.....	13
圖十五、藍綠菌菌相組成比例圖.....	14
圖十六、遠紅光藍綠菌相對豐度.....	15

圖十七、NTU06、NTU10、NTU14 遠紅光藍綠菌菌相組成比例圖 16

圖十八、主要八種菌門相對豐度.....17

圖十九、NTU06、NTU10、NTU14 菌相組成比例圖18

圖二十、八種菌門相對豐度.....20

表次

表一、B-HEPES 培養液配方.....	4
-----------------------	---



第一章 介紹

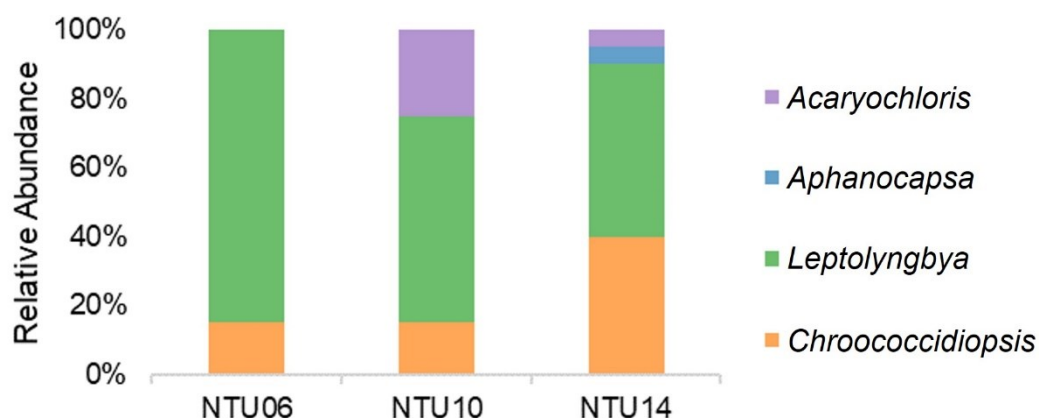


1.1 研究動機

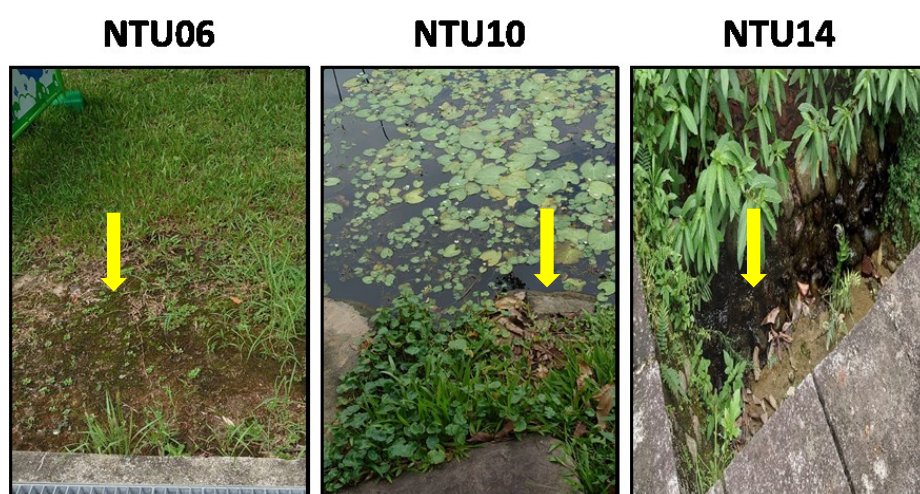
大部分行光合作用的生物如植物、藻類等僅能利用有效光合輻射 (波長: 400-700 nm) 的光能, 但部分特殊的藍綠菌發展出能夠利用能量較低的遠紅光 (波長: 700-800 nm) 行光合作用 (Ho et al., 2021)。目前已知藍綠菌為革蘭氏陰性菌 (Castenholz., 2015), 其中遠紅光藍綠菌與大多數藍綠菌具有相似的生理特性, 它們通常偏好鹼性環境並對環境條件具有廣泛的耐受性, 從南北極至溫泉皆有遠紅光藍綠菌的蹤跡 (Touloupakis et al., 2016; Pikuta et al., 2007), 由於藍綠菌是光合自營細菌, 能適應較低營養的環境, 因此在實驗室中常使用去除碳源、pH 值為 8 的培養基進行培養。然而, 遠紅光藍綠菌的研究相對有限, 純化過程耗時且複雜, 限制了對遠紅光藍綠菌的進一步研究進展。因此, 加速遠紅光藍綠菌的純化過程對於後續研究具有重要意義。

使用抗生素是純化分離菌株常見的方法, 藉由抗生素抑制純化目標對象以外的細菌, 提高目標對象的相對豐度, 使其在整體菌相中的比例上升, 增加純化成功的機率, 加速純化過程 (Rippka., 1988)。但目前針對遠紅光藍綠菌適合使用的抗生素與使用濃度尚未有明確的測試, 本研究使用 Novobiocin 及 Imipenem 做測試。Novobiocin 屬於 aminocoumarin antibiotics, 這類的抗生素會與細菌的 DNA gyrase 上的 B subunit 結合, 進而達到抑制 DNA gyrase 的效果, 使細菌生理功能無法正常運行, Novobiocin 目前在臨床上用於治療 *Staphylococcus* 造成的疾病, 由於 Novobiocin 對於革蘭氏陰性菌的影響較革蘭氏陽性菌小, 對於藍綠菌 (革蘭氏陰性菌) 的影響可能較小 (Fairbrother et al., 1956; Biswas et al., 2023)。Imipenem 則是透過抑制細菌合成細胞壁來達到抑制細菌生長的效果 (Hellinger et al., 1991)。pH 值也是培養微生物時重要的環境條件之一, 不適合的 pH 值可能對微生物有害, 造成細胞膜電荷不平衡, 或是蛋白質變性, 使微生物死亡 (Lund et al., 2020)。本研究透過調整培養基不同 pH 值的方式分析純化遠紅光藍綠菌的最佳環境條件。由於藍綠菌為自營性的生物, 即使生長在低營養的環境也可以適應, 但異營性微生物需要依靠環境中的養分維生, 因此調整培養基營養條件, 或許可以降低異營性微生物的數量, 加速藍綠菌的純化。在進行環境採樣及培養前, 測試藍綠菌及遠紅光藍綠菌在不同濃度的 Imipenem 及 Novobiocin 及不同 pH 中是否能正常生長, 作為後續實驗參考, 所使用的兩個菌株為 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn 6803) 及 *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 (Cf9212)。Syn 6803 為藍綠菌的模式菌株, 只能利用可見光行光合作用, 其形態為單細胞 (Yu et al., 2013)。Cf9212 是目前遠紅光藍綠菌中較多研究的菌株 (Ho et al., 2019), 它的細胞會聚集, 形成絲狀型態, 其發現位置為溫泉 (Gan et al., 2015)。這兩個菌株在實驗室中通常會以 B-HEPES Medium 培養。以這兩個菌株作為培養條件測試對象, 測試實驗中的培養條件為藍綠菌可接受的生長條件。

由於本研究目標開發有效純化遠紅光藍綠菌方法，選擇以知具有遠紅光藍綠菌分布的樣本點。參考先前實驗中在台大校園裡的三個採樣點，對於這三個樣點的遠紅光藍綠菌菌相組成已有所了解 (圖一) (Ko et al., 2024)，因此選擇這三個採樣點為測試對象，採樣環境位置如圖二。



圖一、台大校園內採樣點 NTU06、NTU10、NTU14 的遠紅光藍綠菌菌相組成 (modified from Ko et al., 2024)



圖二、採樣環境

箭頭處為採樣位置，NTU06採集草地表面綠色處，NTU10採集水邊石頭與水面交界處的綠色附著物，NTU14採集池子下方石頭表面的生物膜。
(modified from Ko et al., 2024)

1.2 文獻探討

先前已有使用 Imipenem (Ferris et al., 1991) 及 Novobiocin (Hartnell et al., 2016) 純化藍綠菌的文獻發表。在 Imipenem 研究中，研究團隊使用不同抗生素處理受

到其他細菌污染的藍綠菌樣本，結果顯示使用 Imipenem 100 µg/ml 處理受到其他細菌污染的樣本 18 小時後，樣本中的細菌數量比原先樣本降低了 100 倍，相比該研究中使用的其他抗生素更有效。此外，該研究也發現對不同環境的樣本使用 Imipenem 處理都有效，如：淡水、海水及陸地。在 Novobiocin 研究中，研究團隊使用 Novobiocin 5 µg/ml 處理兩種淡水藍綠菌 *Microcystis* sp. 及 *Synechococcus* sp.，結果顯示 Novobiocin 5 µg/ml 對這兩種藍綠菌的生長皆不會造成影響。參考過去研究可知，使用 Imipenem 及 Novobiocin 處理對純化藍綠菌是可行的方法，但未曾提及使用 Imipenem 及 Novobiocin 處理後的菌相變化，本研究處理條件包含這兩種抗生素，預期對純化遠紅光藍綠菌也有相似效果，並探討這兩種抗生素處理後樣本的菌相變化。

本實驗室先前的研究中 Planctomycetota 及 Bacteroidota 的相對豐度在使用 B-HEPES Medium 於可見光及遠紅光培養後上升 (Ko et al., 2024)，因此在本研究中使用不同條件測試，目的是要讓 Planctomycetota 及 Bacteroidota 相對豐度降低。Planctomycetota 的細胞壁結構較複雜且有其重要的生理功能，本研究使用透過抑制細菌合成細胞壁來達到抑制細菌生長的 Imipenem 或許能夠抑制 Planctomycetota 合成細胞壁以達到抑制生長的效果。Bacteroidota 屬於革蘭氏陰性菌，使用對革蘭氏陰性菌影響較小的 Novobiocin 可能效果較差，因此預期使用 Imipenem 處理可以降低較多 Bacteroidota。除此之外，Planctomycetota 與 Bacteroidota 的生存環境多元，如淡水、海洋、陸地等 (Wiegand et al., 2018; Flint et al., 2014)，環境 pH 值及營養變化大，因此預期本實驗中的 pH10 及營養稀釋條件可能對降低 Planctomycetota 與 Bacteroidota 相對豐度效果有限。

第二章 材料方法



2.1 培養條件測試

使用菌株 Syn 6803 及 Cf9212，測試本研究所使用抗生素、改變培養基的酸鹼值培養藍綠菌是否可行。在培養條件測試實驗中，皆使用將 citric acid 與 $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{Citrate}$ 用 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 替換的 B-HEPES Medium 進行液態培養，於六孔盤中，將初始 OD_{750} 值設定為 0.2，置於白光光度為 50 Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) 的環境中培養 20 天，實驗為一重複。抗生素耐受度測試中使用 Novobiocin 濃度 5、7.5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 Imipenem 濃度為 5、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 B-HEPES Medium 培養液，加入菌株後進行 24 小時暗處理，再移至白光下。在酸鹼值測試中使用 pH 值為 6、8、10 的 B-HEPES Medium 培養液測試。第 0、4、7、11、15、20 天測量 OD_{750} 值。

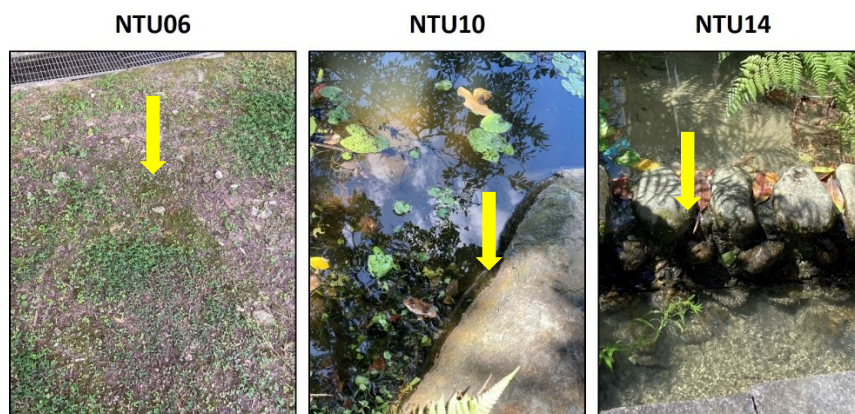
表一、B-HEPES 培養液配方

藥品名稱	數量
NaNO_3	1.5 g
K_2HPO_4 (15.3 g/L)	3 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 g/L)	0.95 ml
citric acid (6.5 g/L)	1.0 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{Citrate}$ (12 g/l)	2 ml
NaEDTA (tetra) (3 g/l)	0.33 ml
Na_2CO_3 (20 g/l)	1 ml
A5+ Co Mineral trace mix	1 ml
HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid)	1.1 g

表中為配置 1 L 所需的各藥品用量，使用 2M KOH 將 pH 值調整到 8。其中 A5+ Co Mineral trace mix 為 1 ml 溶液中，含有 2.86 g H_3BO_3 、1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.222 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.0491 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

2.2 環境採樣

使用刮勺、1.5 ml 微量離心管收集樣本，採樣前使用酒精消毒刮勺，採樣位置如箭頭所示 (圖三)，於 NTU06 樣點採集草地表面綠色附著物，於 NTU10 及 NTU14 樣點採集水邊石頭上與水面交界處的附著物，各樣點採集 2 至 3 管，接著將採樣得到的三個樣本各自混合均勻。



圖三、採集樣點位置

2.3 培養條件

使用加入 Cycloheximide 100 $\mu\text{g/ml}$ 且將 citric acid 與 $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{ Citrate}$ 用 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 替換的 B-HEPES Medium 進行液態培養，於六孔盤中，將初始樣本體積設定為 0.2 ml，總體積為 10 ml，置於白光光度為 50 PPFD 的環境中培養 14 天，實驗為三重複。第一部分為加入 Novobiocin 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 濃度為 5、50 $\mu\text{g/ml}$ 的 B-HEPES Medium 培養液中，進行 24 小時暗處理，再移至白光下培養。第二部分使用 pH 值為 10 的 B-HEPES Medium 培養液培養。第三部分置於稀釋 2 倍與 4 倍的 B-HEPES Medium 培養液中培養。實驗進行 14 天後收集結果。

2.4 DNA 萃取、16S rDNA V3-V4 片段定序

將環境樣本與培養後的樣本使用 10 mM Tris-HCl 緩衝液清洗，收集 0.25 ml 請洗過的樣本置於乾淨離心管中，使用 DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen, USA) 萃取 DNA，接著使用 KAPA HiFi PCR kit 進行 16S rDNA V3-V4 片段 PCR，primer 為 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。PCR 反應過程為：首先在 95°C 下反應 3 分鐘；接著以 98°C 反應 20 秒，57.5°C 反應 20 秒，72°C 反應 20 秒，進行 25 個循環；最後在 72°C 下進行 3 分鐘。各取產物 3 μl 跑膠，使用 2% Agarose Gel。並用 Illumina Miseq 得到 2×465 bp rDNA 序列。

2.5 定序資料分析與統計方法

使用 Qiime2 與 DADA2 套件用於 16S rDNA V3-V4 定序資料的前處理，將品質較低的序列刪除 (Phred score < 25、長度 < 350 bp)，篩選出可信度較高、品質較好的序列，接著將每個樣本稀釋至 19004 條序列以降低採集量不同導致的差異，使用 silva database (ver.138) (Quast et al., 2013; Rognes et al., 2016)、cyano database (Ko et al., 2024) 以及 FRCI (Ko et al., 2024) 比對序列獲得菌相種類，最後利用 python 分析菌相組成與 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) 分群作圖，繪製全菌相、藍綠菌及遠紅光藍綠菌的相對豐度盒鬚圖以及組成比例長條圖。考量數據為非常態分佈及獨立樣本的特性，選擇不需要假設數據為常態分佈且可以比較多組獨立數據的 kruskal wallis test 作為計算相對豐度顯著差異的方法 (Kruskal et al., 1952)。

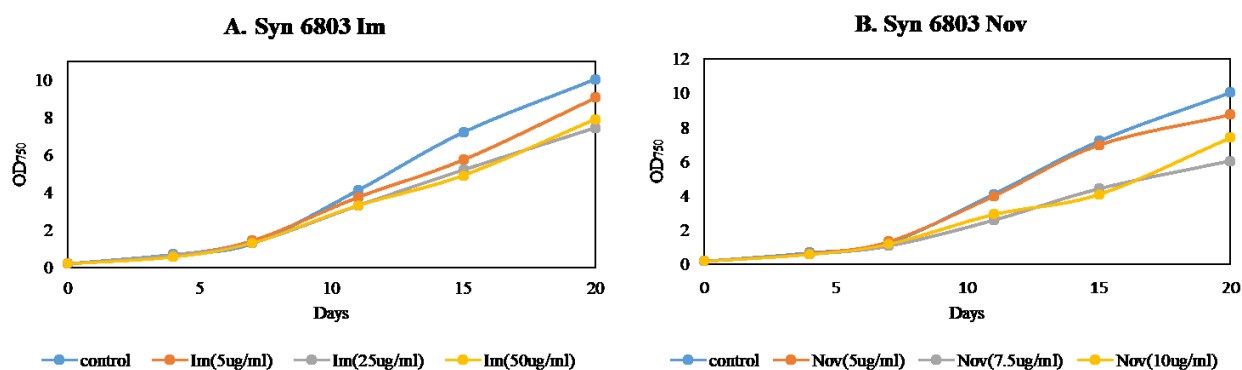
第三章 結果

3.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 及 *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212

在 Imipenem、Novobiocin 以及 pH10 環境中皆可正常生長

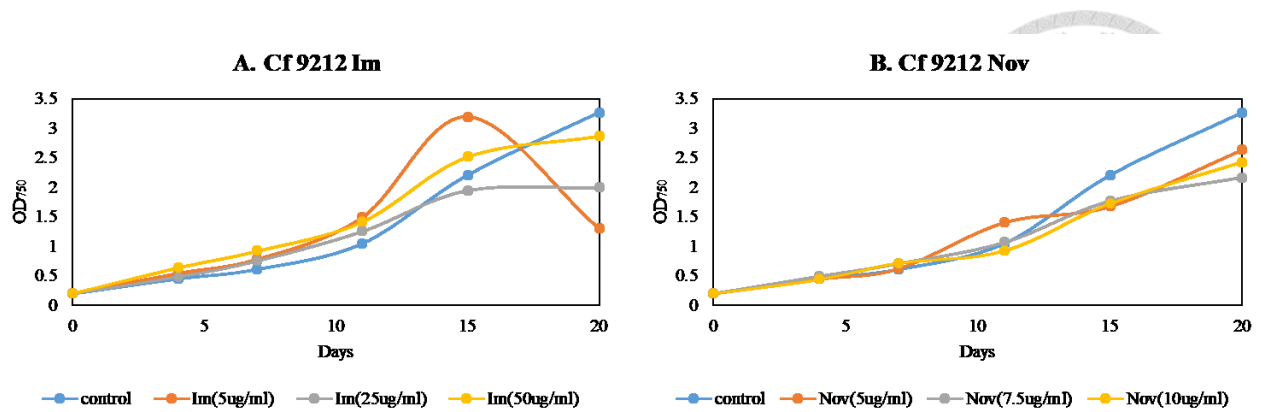
使用 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn 6803) 及 *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 (Cf 9212) 進行抗生素濃度及 pH 值測試。根據圖四可知，使用 Imipenem 及 Novobiocin 對 Syn 6803 生長不會造成太大影響。圖五中，可以發現 Cf 9212 在 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 中 15 天內皆能正常生長，但超過 15 天後 OD₇₅₀ 下降超過 2 倍，在 Imipenem 25 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 中則可以正常生長，在 Novobiocin 5、7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 中 Cf 9212 皆能正常生長。在圖六 pH 值測試中，Syn 6803 及 Cf 9212 在 pH 6 的處理中生長情況較差，在 pH 8、pH 10 處理下則能夠正常生長，其中，在培養 15 天內 pH 10 處理下 Syn 6803 及 Cf 9212 的生長情形較好。

綜合培養條件測試結果並考量環境樣本培養時間約 14 天，Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 與 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 以及 pH 10 不會對生長造成太大影響，因此選擇這些條件進行後續實驗。

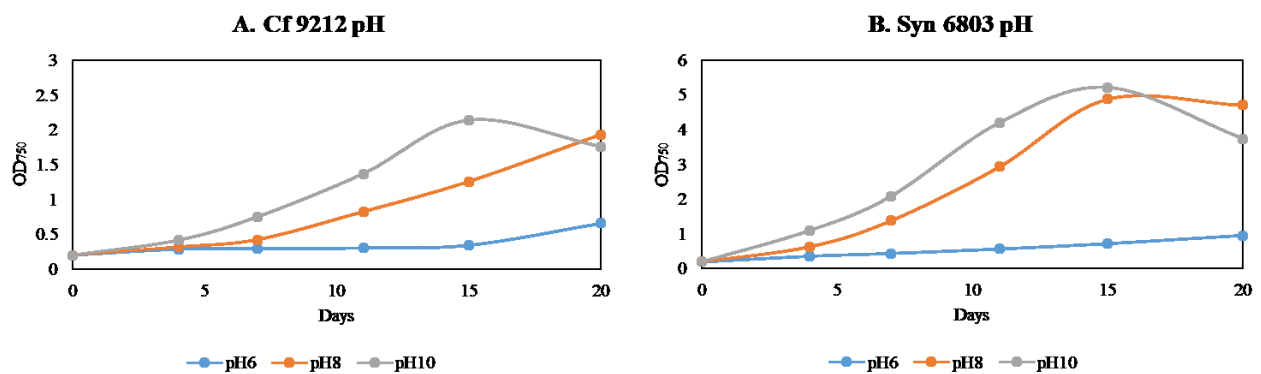


圖四、*Synechocystis* sp. PCC 6803 抗生素濃度培養測試

Syn 6803 以 Imipenem 5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (A)，Syn 6803 以 Novobiocin 5、7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (B)，實驗為一重複。



圖五、*Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 抗生素濃度培養測試
Cf 9212 以 Imipenem 5、25、50 µg/ml 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (A)，Cf 9212 以 Novobiocin 5、7.5、10 µg/ml 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (B)，實驗為一重複。



圖六、*Synechocystis* sp. PCC 6803 及 *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 pH 值培養測試

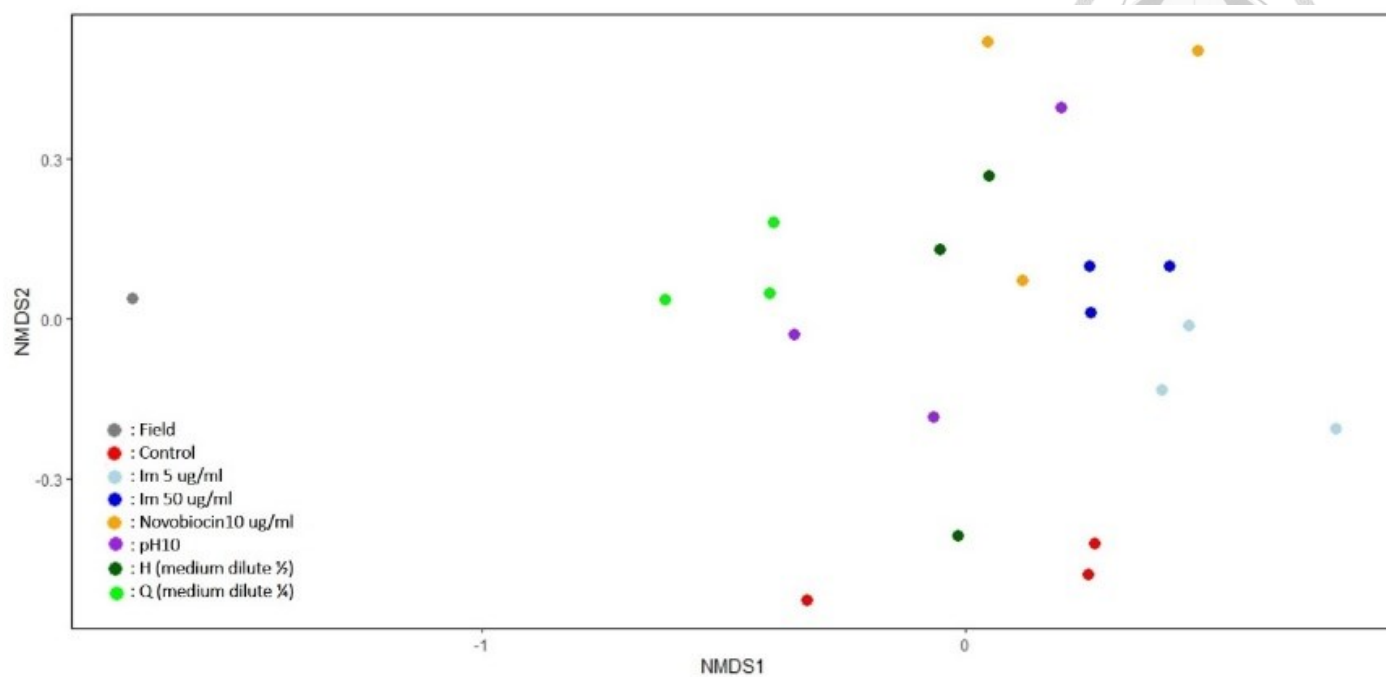
Cf 9212 以 pH 6、8、10 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (A)，Syn 6803 以 pH 6、8、10 處理 20 天內 OD₇₅₀ 值變化 (B)，實驗為一重複。

3.2 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) 分群作圖中顯示不

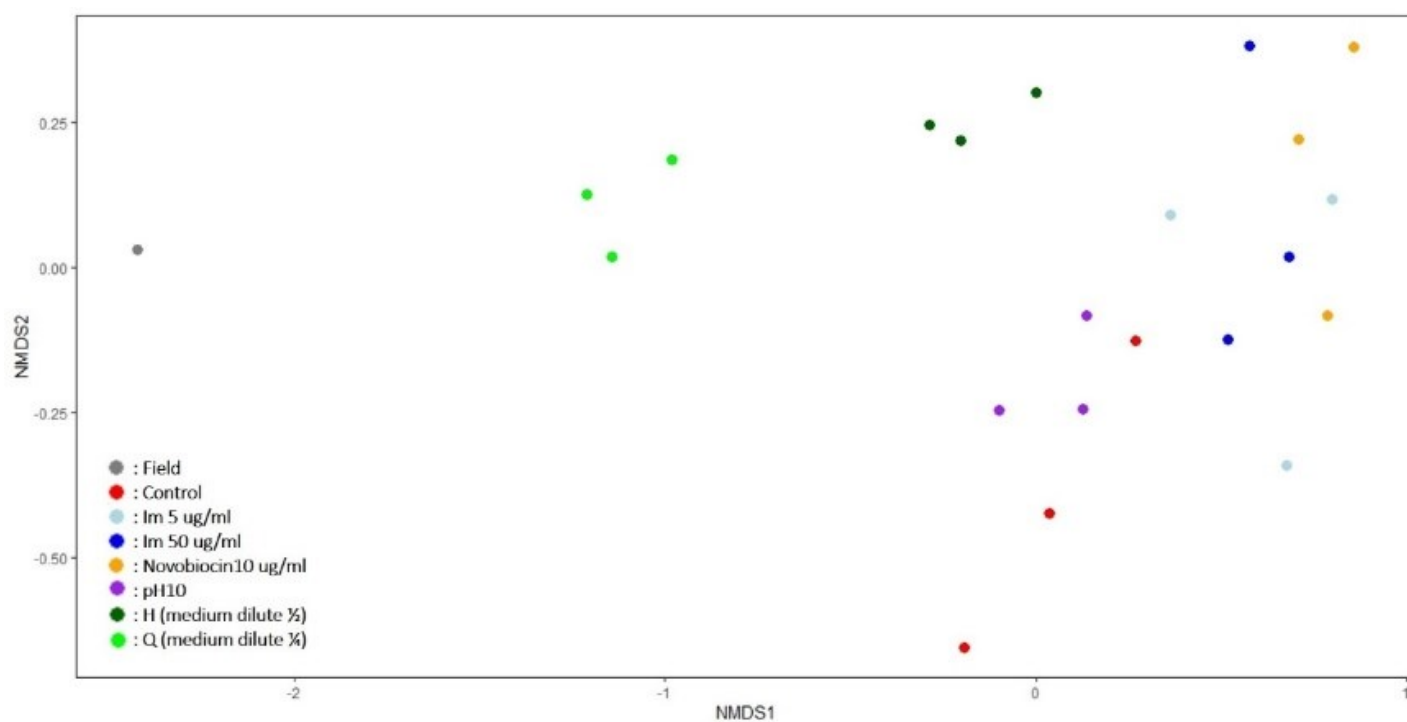
同處理之間以及培養前後存在差異

根據圖七、圖八、圖十，可以發現三個樣點的環境樣本與培養後的樣本全菌相有明顯差異，且相同處理的三重複會聚集成一群，不同處理之間也能看出差異。圖八中 NTU14 環境樣本與培養後的所有樣本差距過大，導致無法看出培養後樣本之間的區別，去除環境樣本後作圖即可看出不同處理之間存在差異 (圖十)。圖十一、圖十二及圖十三為 NTU06、NTU10、NTU14 藍綠菌 NMDS 作圖。圖中可發現三個樣點的環境樣本與培養後樣本有明顯差異，但與全菌相 NMDS 作圖相比，培養後的各處理之間差異較少。表示實驗中設定的處理條件的確可以對樣本產生影響，並且相同類型的處理之間範圍重疊較多，如：抗生素組 (Imipenem 5

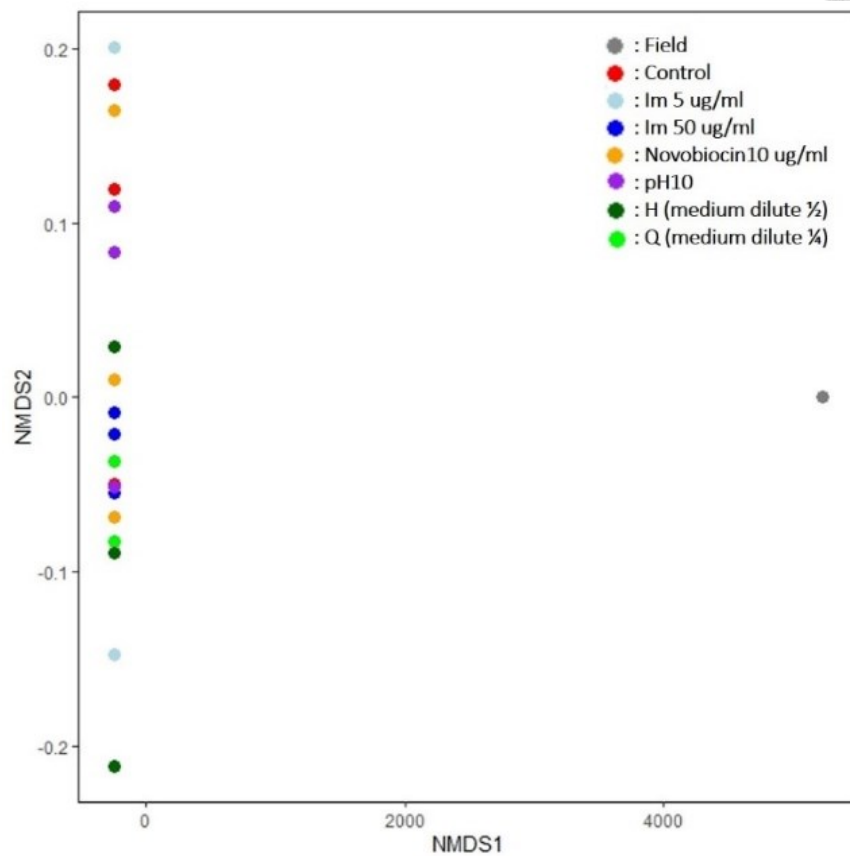
μg/ml、Imipenem 50 μg/ml、Novobiocin 10 μg/ml)。



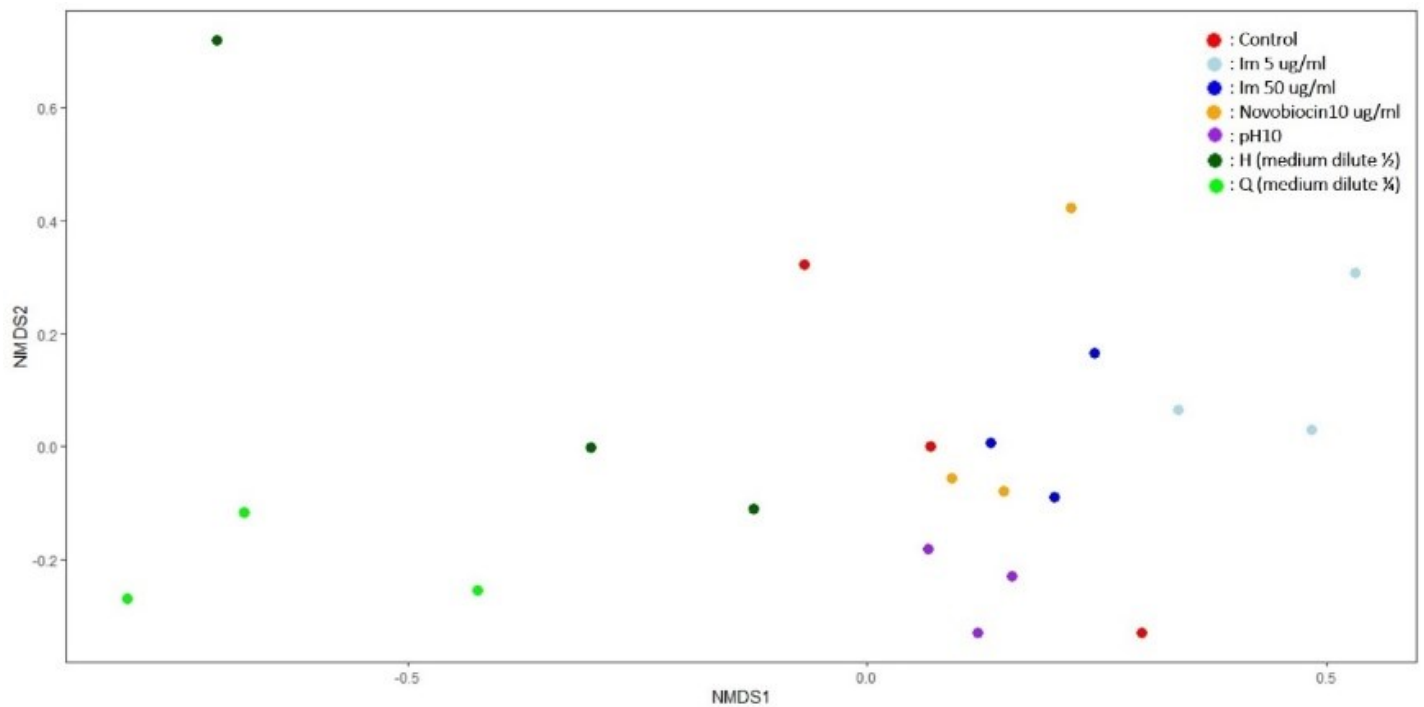
圖七、NTU06全菌相 NMDS 作圖



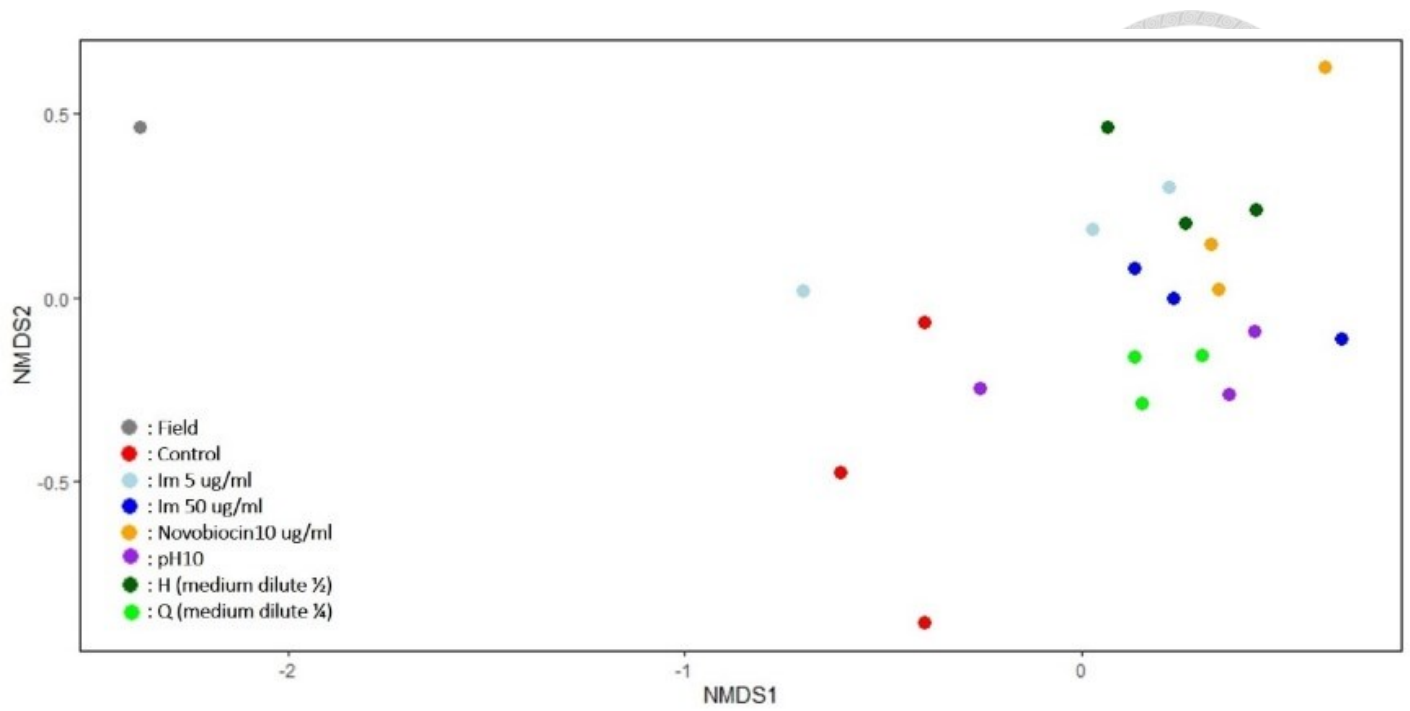
圖八、NTU10全菌相 NMDS 作圖



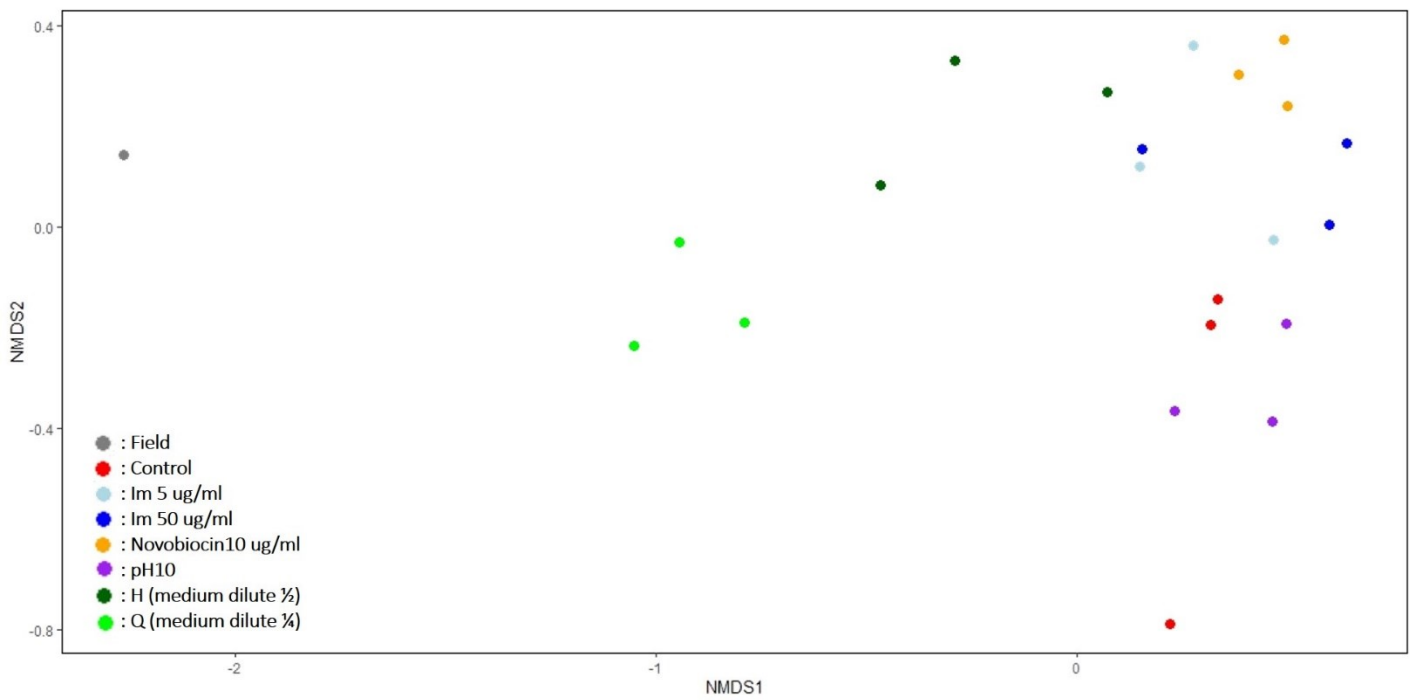
圖九、NTU14全菌相 NMDS 作圖



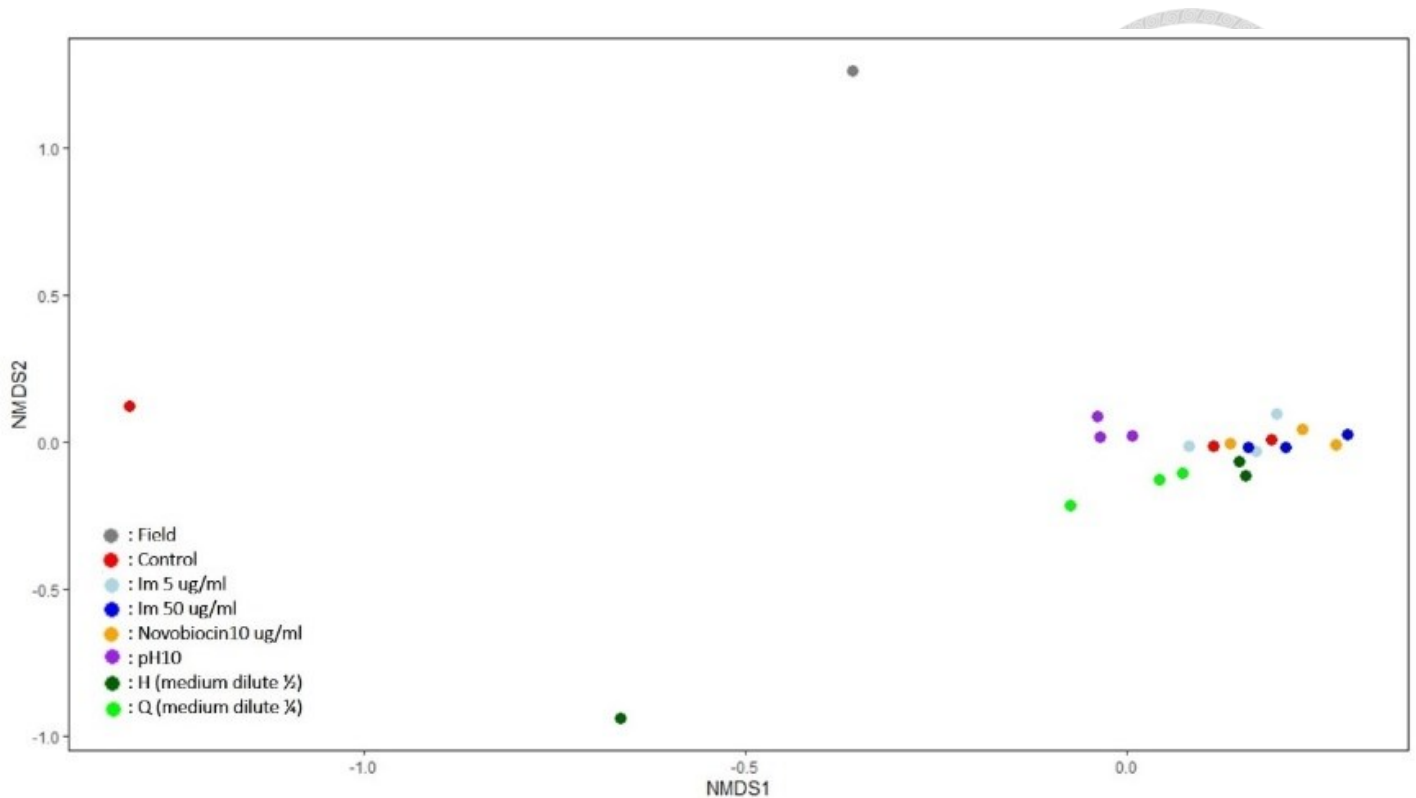
圖十、NTU14培養後樣本全菌相 NMDS 作圖



圖十一、NTU06藍綠菌 NMDS 作圖



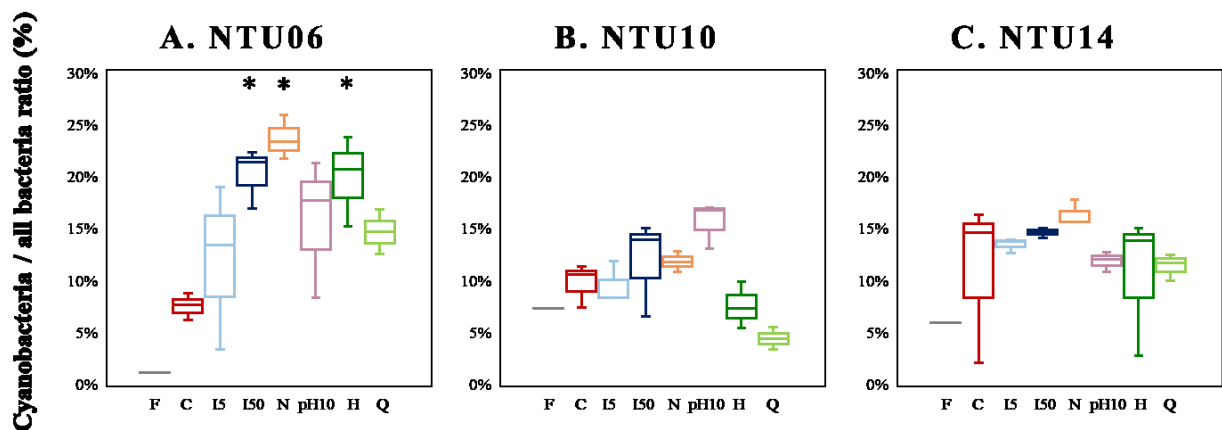
圖十二、NTU10藍綠菌 NMDS 作圖



圖十三、NTU14 藍綠菌 NMDS 作圖

3.3 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 培養後提升最多藍綠菌相對豐度

根據圖十四可知，所有培養後樣本除了 NTU10 中的營養稀釋 1/4 處理 (Q) 以外，其餘處理的藍綠菌相對豐度皆大於環境樣本。在 NTU06 中，所有條件處理過後的藍綠菌相對豐度皆大於控制組，能夠顯著提升藍綠菌相對豐度的處理為 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及營養稀釋 1/2 (H)，其中 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 的效果最好。在 NTU10 樣點中，使用 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、pH 10 及 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 提升的藍綠菌相對豐度較控制組高，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 的效果最好。在 NTU14 樣點中，Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 處理後的藍綠菌相對豐度高於控制組。綜合以上可知，實驗中使用的處理都能在一定程度上增加藍綠菌相對豐度，其中使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 在三個樣點中都能增加較控制組多的藍綠菌相對豐度。



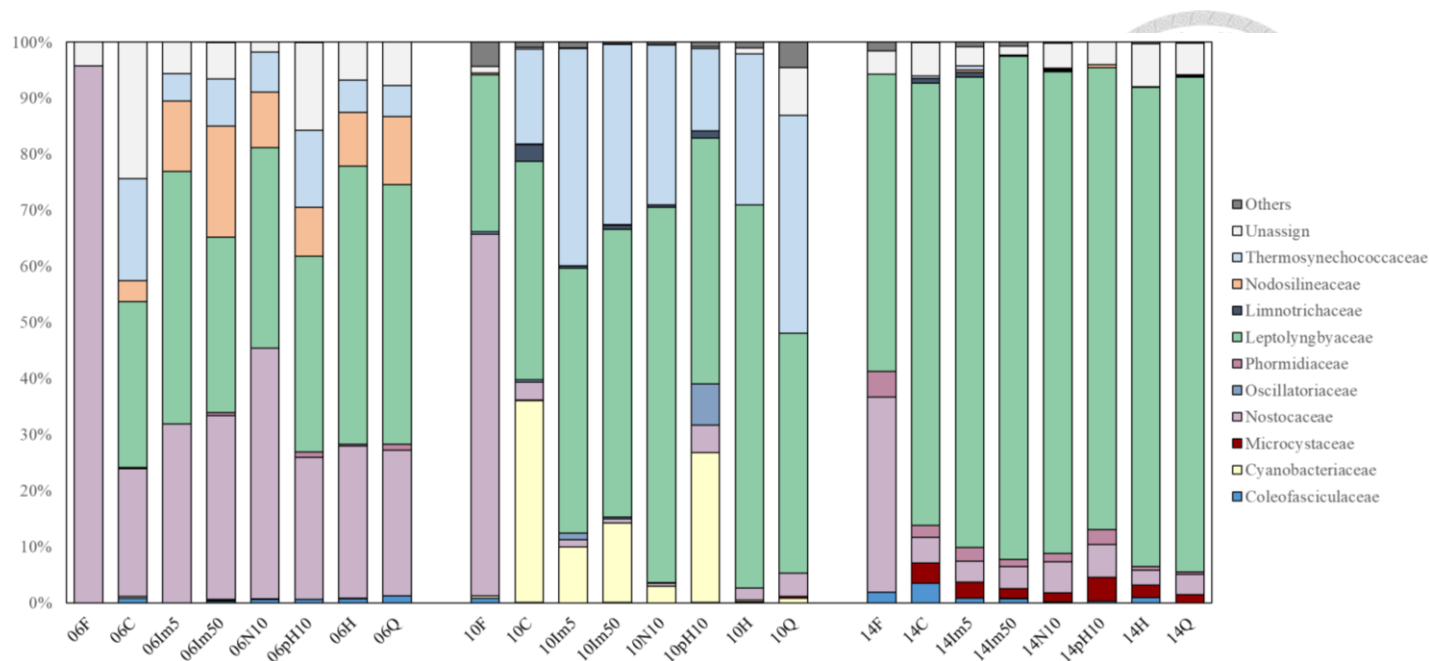
圖十四、藍綠菌相對豐度

F 代表環境樣本，C 代表控制組，I5 代表 Imipenem 5 µg/ml，I50 代表 Imipenem 50 µg/ml，N 代表 Novobiocin 10 µg/ml，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。* 代表使用 kruskal wallis test 計算和控制組相比存在顯著差異 ($p < 0.05$)。

3.4 培養後的藍綠菌組成比例與環境樣本存在差異

根據圖十五可知，三個採樣點中 Nostocaceae 比例在經過培養後均下降，在 NTU06 中降低了超過 50%；在 NTU10 中降低超過 60%，培養後 Nostocaceae 比例在各條件中皆不超過 10%；在 NTU14 中降低超過 20%，培養後 Nostocaceae 比例在各條件中皆為 5% 左右。三個採樣點中 Leptolyngbyaceae 比例在培養後均上升，在 NTU06 中培養後的 Leptolyngbyaceae 比例上升了超過 30%，其中在營養稀釋 1/2 (H) 及營養稀釋 1/4 (Q) 培養後上升比例到 50%。在 NTU10 中培養後的 Leptolyngbyaceae 比例上升了超過 10%，其中 Novobiocin 10 µg/ml 及營養稀釋 1/2 (H) 培養後 Leptolyngbyaceae 比例上升 60%。在 NTU14 中培養後的 Leptolyngbyaceae 比例上升超過 20%。Thermosynechococcaceae 比例在 NTU06 及 NTU10 中，培養後的比例皆上升。Nodosilineaceae 比例在 NTU06 中上升超過 5%，在 Imipenem 50 µg/ml 培養後的比例上升最多。在 NTU10 中培養後的 Cyanobacteriaceae 比例除了營養稀釋處理以外皆上升。

綜合上述可知，培養的過程對藍綠菌各菌相的組成比例有一定程度的影響。



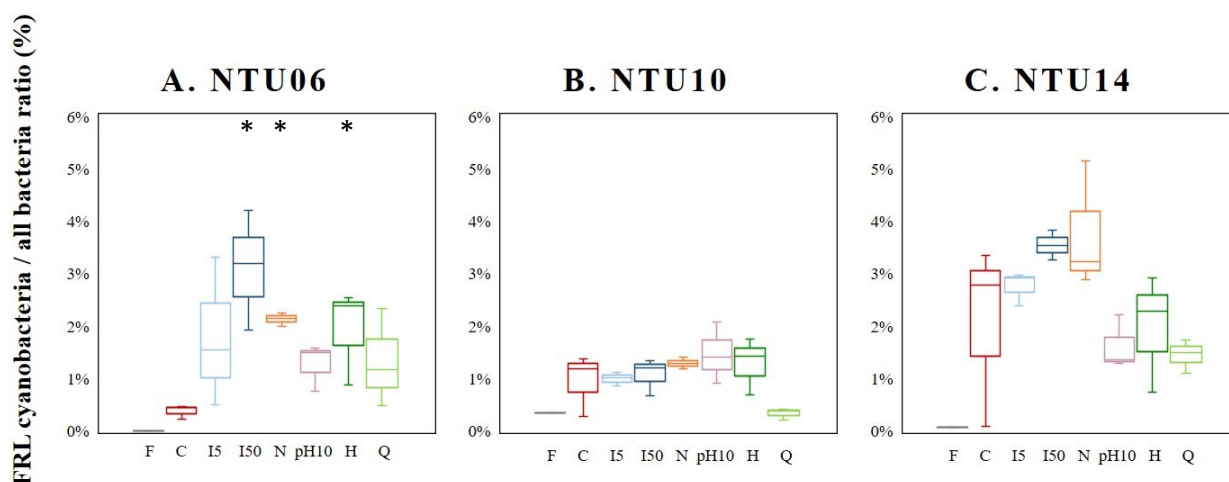
圖十五、藍綠菌菌相組成比例圖

06 代表 NTU06 樣點，10 代表 NTU10 樣點，14 代表 NTU14 樣點。F 代表環境樣本，C 代表控制組，Im5 代表 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ ，Im50 代表 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ ，N10 代表 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ ，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。

3.5 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後提升較多遠紅光藍綠菌相對豐度

根據圖十六可知，培養後樣本除了 NTU10 中的營養稀釋 1/4 (Q) 以外，其餘處理後的遠紅光藍綠菌相對豐度皆大於環境樣本。在 NTU06 中，所有條件培養後的遠紅光藍綠菌相對豐度皆大於控制組，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、營養稀釋 1/2 (H) 及 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 與控制組相比有顯著差異，Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 能增加最多藍綠菌相對豐度。在 NTU10 中，營養稀釋 1/2 (H)、pH 10 處理及 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後的遠紅光藍綠菌相對豐度較控制組多，但並無顯著差異，Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 處理後的遠紅光藍綠菌相對豐度則是和控制組相近，Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 及營養稀釋 1/4 (Q) 的遠紅光藍綠菌相對豐度低於控制組。在 NTU14 中，Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 處理後的遠紅光藍綠菌相對豐度高於控制組，但無顯著差異，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 提升遠紅光藍綠菌相對豐度的效果最好。

綜合以上可知，實驗中使用的處理都能在一定程度上增加遠紅光藍綠菌相對豐度，其中使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 在三個樣點中都能增加較多藍綠菌相對豐度。

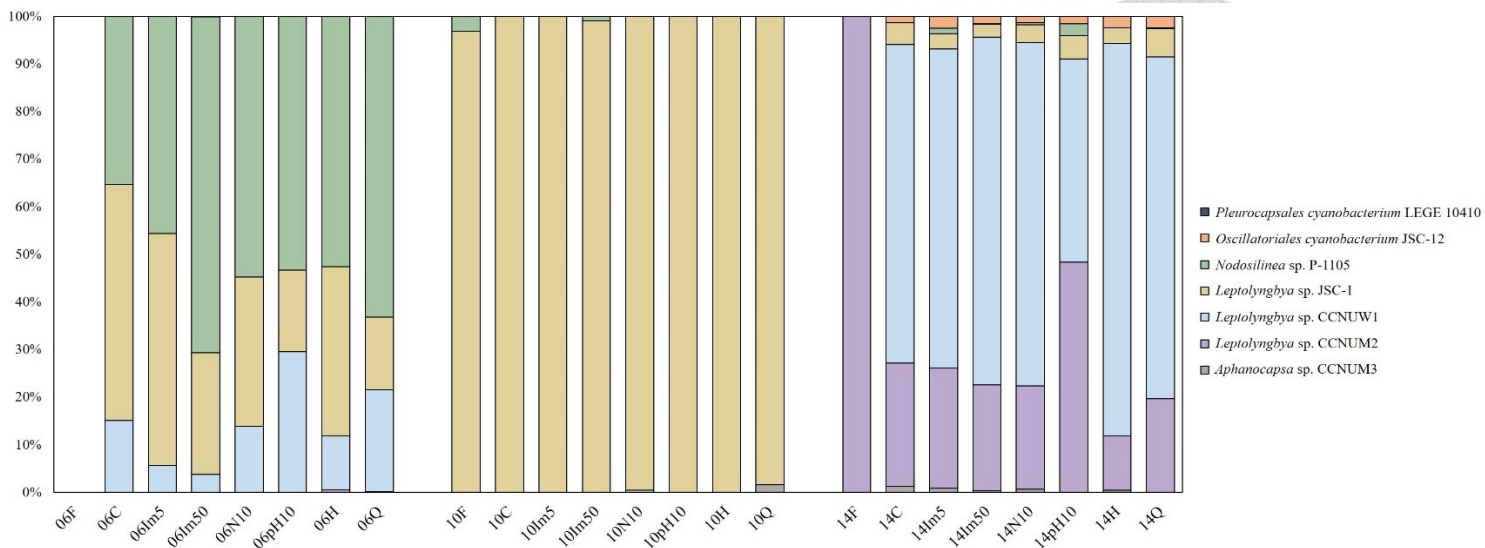


圖十六、遠紅光藍綠菌相對豐度

F 代表環境樣本，C 代表控制組，I5 代表 Imipenem 5 µg/ml，I50 代表 Imipenem 50 µg/ml，N 代表 Novobiocin 10 µg/ml，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。* 代表使用 kruskal wallis test 計算和控制組相比存在顯著差異 ($p < 0.05$)。

3.6 培養後遠紅光藍綠菌組成比例與環境相似

根據圖十七可知，在 NTU06 中，環境樣本中沒有偵測到遠紅光藍綠菌的序列，但在培養後的樣本中發現有 3 種以上的遠紅光藍綠菌存在，*Nodosilinea* sp. P-1105 及 *Leptolyngbya* sp. JSC-1 占比超過 60%。NTU10 中，培養前後的菌相組成無太大改變，均以 *Leptolyngbya* sp. JSC-1 為主，占比超過 90%。NTU14 中，培養後樣本的菌相組成與環境樣本不同，環境樣本定序得到的資料顯示有高達 90% 的 *Leptolyngbya* sp. CCNUW2，但培養後的樣本中 *Leptolyngbya* sp. CCNUW2 比例下降，*Leptolyngbya* sp. CCNUW1 比例上升 40-70%，其中使用營養稀釋 1/2 (H) 處理後 *Leptolyngbya* sp. CCNUW1 比例下降最多，對整體菌相影響最大。此外，培養後 *Oscillatoriales cyanobacterium* JSC-12 及 *Leptolyngbya* sp. JSC-1 比例皆有小幅度上升，整體菌種種類較培養前多元，可能是整體藍綠菌在培養後比例上升所致。

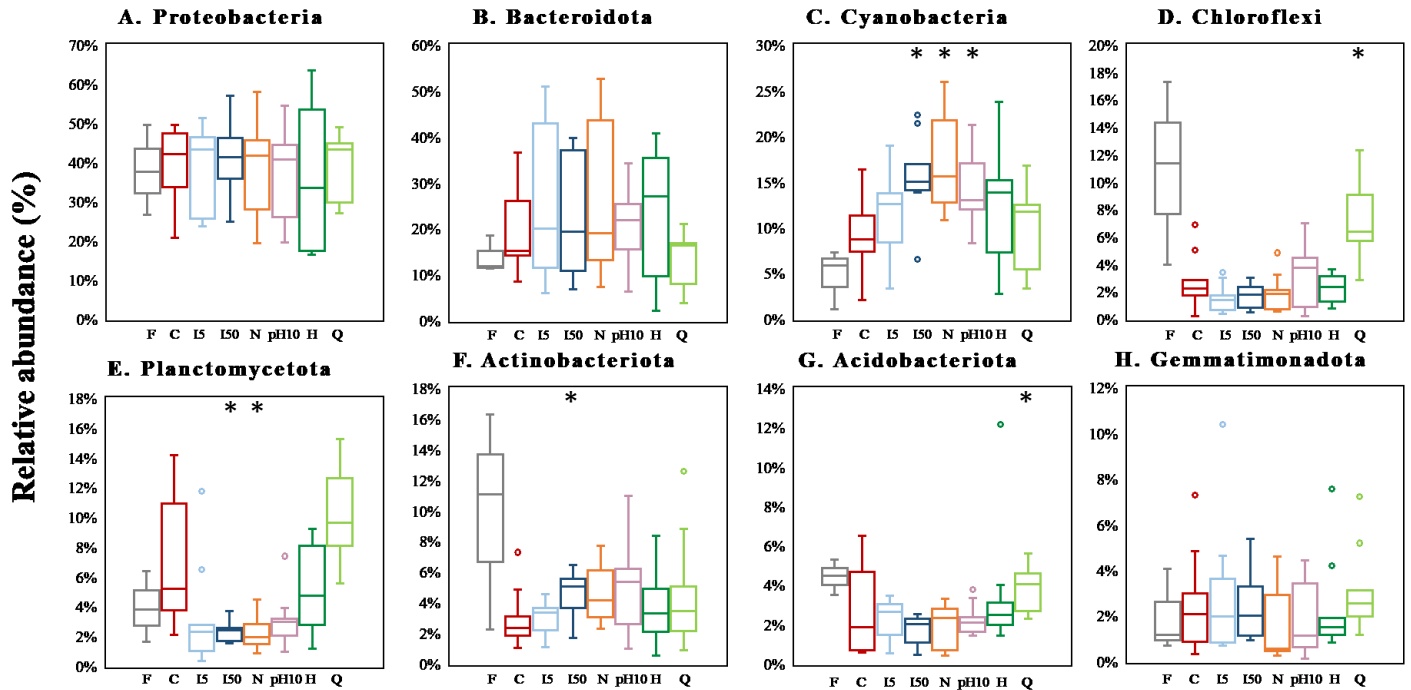


圖十七、NTU06、NTU10、NTU14 遠紅光藍綠菌菌相組成比例圖

06 代表 NTU06 樣點，10 代表 NTU10 樣點，14 代表 NTU14 樣點。F 代表環境樣本，C 代表控制組，Im5 代表 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ ，Im50 代表 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ ，N10 代表 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ ，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。

3.7 其他細菌培養前後的相對豐度趨勢不一致

根據圖十八，在 Proteobacteria 中，培養前後無顯著差異。在 Bacteroidota 中，所有條件培養後的 Bacteroidota 相對豐度均高於環境樣本，且與控制組相比沒有顯著降低相對豐度的效果。在 Cyanobacteria 中，所有條件培養後的 Cyanobacteria 相對豐度皆高於控制組，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 pH10 處理與控制組存在顯著差異。在 Chloroflexi 中，培養後的相對豐度皆低於環境。與控制組相比，Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及營養稀釋 1/2 (H) 培養後 Chloroflexi 相對豐度有些微下降但無顯著差異，而使用營養稀釋 1/4 (Q) 處理則會使 Chloroflexi 相對豐度上升，與控制組相比存在顯著差異。在 Planctomycetota 中，抗生素組 (Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$) 及 pH 10 培養後相對豐度較控制組低，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 和控制組相比有顯著差異。在 Actinobacteriota 中，控制組及其他條件培養後的 Actinobacteriota 相對豐度皆低於環境樣本，但所有條件培養後的 Actinobacteriota 相對豐度均高於控制組，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 與控制組相比有顯著差異。在 Acidobacteriota 中，控制組及其他條件培養後的 Acidobacteriota 相對豐度均低於環境樣本，但所有條件培養後的 Acidobacteriota 相對豐度皆高於控制組，其中營養稀釋 1/4 (Q) 與控制組相比有顯著差異。在 Gemmatimonadota 中，所有條件培養後與環境樣本之間沒有顯著降低相對豐度的效果。

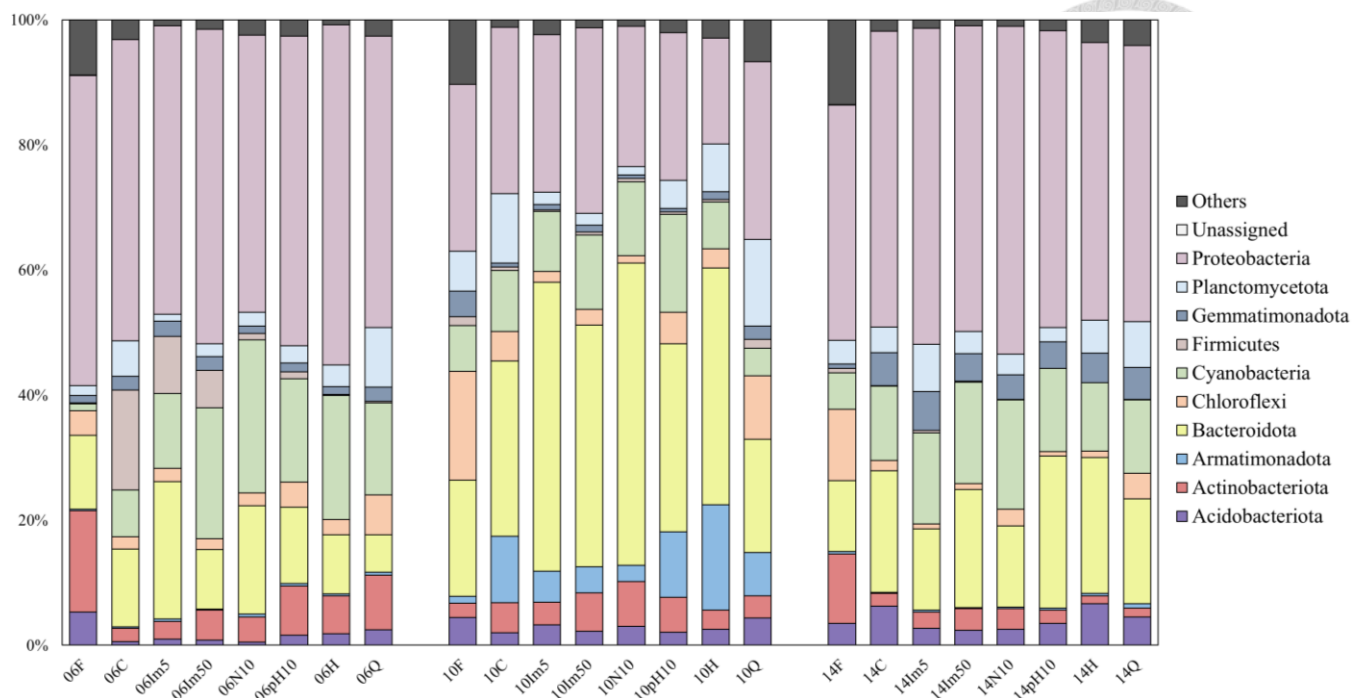


圖十八、主要八種菌門相對豐度

F 代表環境樣本，C 代表控制組，I5 代表 Imipenem 5 µg/ml，I50 代表 Imipenem 50 µg/ml，N 代表 Novobiocin 10 µg/ml，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。* 代表使用 kruskal wallis test 計算和控制組相比存在顯著差異 ($p < 0.05$)，。為極端值。

3.8 培養後的菌相組成在比例上與環境有些微差異但菌種的組成並無太大改變

由圖十九可知，Proteobacteria 及 Bacteroidota 在培養前後皆佔整體菌相比比例大於 50%，Chloroflexi 在三個樣點中的營養稀釋 1/4 (Q) 培養後比例皆高於其他處理。在 NTU06 中，Actinobacteriota 及 Acidobacteriota 比例在培養後均下降，和控制組相比，Firmicutes 比例在 Novobiocin 10 µg/ml、pH 10、營養稀釋 1/2 及 1/4 處理後皆下降。在 NTU10 中，Armatimonadota 比例在培養後皆上升，其中營養稀釋 1/2 (H) 處理後 Armatimonadota 比例大於控制組，使用其他處理後 Armatimonadota 比例低於控制組，和控制組相比使 Armatimonadota 比例下降最多的處理為 Novobiocin 10 µg/ml。在 NTU14 中，Gemmatimonadota 比例在培養後皆上升。整體而言，使用不同條件培養後的菌相組成在比例上與環境有些微差異，但菌種的組成並無太大改變。



圖十九、NTU06、NTU10、NTU14 菌相組成比例圖

06 代表 NTU06 樣點，10 代表 NTU10 樣點，14 代表 NTU14 樣點。F 代表環境樣本，C 代表控制組，Im5 代表 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ ，Im50 代表 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ ，N10 代表 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ ，H 代表營養稀釋 1/2，Q 代表營養稀釋 1/4。

第四章 討論



4.1 提升藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度的處理探討

本研究測試不同培養條件對藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度的影響，圖十四及圖十六中，所有培養後樣本除了 NTU10 中的營養稀釋 1/4 處理 (Q) 以外，其餘處理的藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度皆大於環境樣本，表示經過培養的確可以提升藍綠菌與遠紅光藍綠菌相對豐度。但培養過程使用的處理條件中只有 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 在三個樣點中的藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度大於控制組。本實驗採集的環境為草地及淡水邊，先前的研究顯示在固體砂石上採集的樣本使用 Novobiocin 30 $\mu\text{g/ml}$ 於培養基培養後能將異營性細菌與藍綠菌分離 (Evans, A. J., 2013)，顯示使用 Novobiocin 對不同環境中的藍綠菌相對豐度提升有一定的幫助。

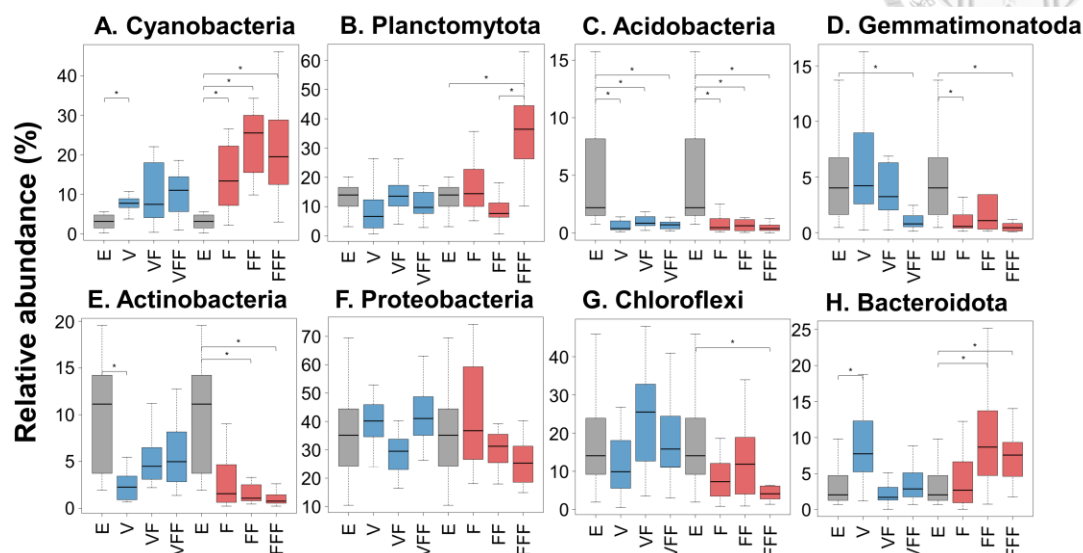
4.2 降低其他細菌相對豐度的處理探討

使用有利於藍綠菌生長的培養條件進行培養可能對其他細菌的相對豐度產生影響，先前的研究顯示 Acidobacteria、Gemmatimonatoda 及 Actinobacteria 此三種菌門在有利於藍綠菌生長的條件培養後，其相對豐度下降 (圖二十) (Ko et al., 2024)，本研究中的結果顯示在培養後相對豐度下降的菌門有 Acidobacteria 和 Actinobacteria，Chloroflexi 及 Planctomycetota 則是在特定培養條件下相對豐度減少。與先前研究相比，本研究使用可見光搭配不同條件培養，使用抗生素處理 (Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$) 及 pH 10 培養後，相對豐度下降的種類多了 Chloroflexi 及 Planctomycetota。

Chloroflexi 的結構多為單層細胞膜，染色結果為革蘭氏陰性 (Sutcliffe., 2010)，考量到 Novobiocin 對革蘭氏陰性菌影響較小，以及 Chloroflexi 在控制組中的相對豐度與使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後相近，推測 Chloroflexi 相對豐度較環境低的主要原因不是 Novobiocin 抑制造成。使用 Imipenem 培養後的結果也與控制組相近，因此推測此兩種抗生素對 Chloroflexi 的抑制效果有限，並非主要降低其相對豐度的原因。

Planctomycetota 分布範圍廣，在水生環境及陸地都能存活，對碳循環及氮循環而言非常重要，為革蘭氏陰性菌 (Wiegand et al., 2018)，最佳生長的 pH 值範圍為 7.0-7.5 (Peeters, S.H et al., 2020; Kohn et al., 2020)。實驗結果發現在 pH 10 培養後 Planctomycetota 相對豐度較控制組低，可能由於此酸鹼度非 Planctomycetota 適合生長的範圍所致。在 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及 Imipenem 5 $\mu\text{g/ml}$ 培養後 Planctomycetota 相對豐度也低於控制組，其中 Imipenem 50 $\mu\text{g/ml}$ 及 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 與控制組相比顯著降低，表示針對抑制細菌合成細胞壁的抗生素及抑制 DNA gyrase 的抗生素對其有效。

根據圖二十可知，Gemmatimonatoda 相對豐度在可見光培養後與環境樣本相似，但經遠紅光培養後相對豐度顯著降低，本研究皆使用可見光進行實驗，可能因此 Gemmatimonatoda 相對豐度沒有下降。



圖二十、八種菌門相對豐度 (Ko et al., 2024)

E 代表環境樣本，V 為可見光培養，VF 為先使用可見光培養後再使用遠紅光培養，VFF 為先使用可見光培養後再使用遠紅光培養兩次，F 為使用遠紅光培養，FF 為使用遠紅光培養兩次，FFF 為使用遠紅光培養三次。在可見光下皆培養 14 天，遠紅光下皆培養 60 天。

4.3 提升最多藍綠菌與遠紅光藍綠菌的處理如何影響其他細菌

提升最多藍綠菌與遠紅光藍綠菌相對豐度的處理為 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ ，此處理能降低 Acidobacteria、Actinobacteria、Chloroflexi 及 Planctomycetota 的相對豐度，但對 Proteobacteria、Bacteroidota 及 Gemmatimonatoda 沒有明顯降低其相對豐度的效果，在使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後 Proteobacteria、Bacteroidota 及 Gemmatimonatoda 相對豐度與環境相似，說明 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 對這些菌門的生長不會造成太大影響。

Proteobacteria 為最大的菌門，其分類下的菌之間差異較大，但其共同特徵為革蘭氏陰性菌 (Rizzatti et al., 2017)，此分類中的被發現含有特殊基因 YacG，來源於大腸桿菌，能夠保護細胞避免受到對 DNA gyrase 有毒的傷害，使用高達 500 $\mu\text{g/ml}$ 的 Novobiocin 處理後對細菌沒有顯著抑制的效果 (Biswas et al., 2023)，且 Proteobacteria 已被證實對高達 19 種抗生素產生抗性 (Hitch et al., 2018)，推測這些可能是在本研究的實驗中使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後 Proteobacteria 相對豐度沒有顯著降低的原因。

Bacteroidota 屬於革蘭氏陰性菌 (Flint et al., 2014)，先前研究指出 Novobiocin 雖然對革蘭氏陰性菌有抑制效果，但對革蘭氏陰性桿菌沒有抑制效果 (Fairbrother et al., 1956)，與本研究的實驗結果相符合，使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後 Bacteroidota 相對豐度沒有顯著降低。

除了上述的菌門，在 NTU06 中也觀察到 Firmicutes 在環境中比例較少，但在控制組中的比例超過 10%，使用 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後 Firmicutes 比例下降低於 1%，可能因 Firmicutes 屬於革蘭氏陽性菌 (Galperin., 2016)，而 Novobiocin 對革蘭氏陽性菌影響較大所致。

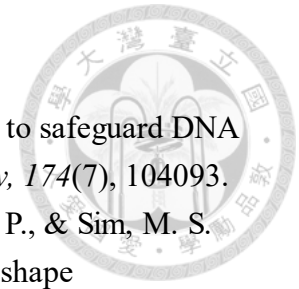
4.4 結論

在本研究中發現經由 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養後能顯著增加藍綠菌及遠紅光藍綠菌相對豐度，且對遠紅光藍綠菌組成比例不會造成太大影響，但對藍綠菌組成比例有影響，Nostocaceae 比例降低，Leptolyngbyaceae 比例上升。Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 對抑制其他細菌也有效，如: Acidobacteria、Actinobacteria、Chloroflexi 及 Planctomycetota，相比其他培養條件，Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理除了增加最多藍綠菌相對豐度，也抑制最多種其他細菌，對後續的純化分離工作提供一個新的培養方法。

4.5 未來研究方向

在本研究中使用可見光進行實驗，未來將設計加入遠紅光搭配 Novobiocin 10 $\mu\text{g/ml}$ 培養，測試較低能量的光照環境是否能降低藍綠菌以外的其他細菌，如: Gemmatimonatoda。此外，本研究只採樣三個地點，未來將新增更多採集地點，測試所使用的培養條件是否在不同環境中皆能使藍綠菌相對豐度增加，擴大其應用範圍。

參考資料



- Biswas, P., Sengupta, S., & Nagaraja, V. (2023). Evolution of YacG to safeguard DNA gyrase from external perturbation. *Research in Microbiology*, 174(7), 104093.
- Bosak, T., Bush, J. W., Flynn, M. R., Liang, B., Ono, S., Petroff, A. P., & Sim, M. S. (2010). Formation and stability of oxygen-rich bubbles that shape photosynthetic mats. *Geobiology*, 8(1), 45–53.
- Castenholz, R. W. (2015). General characteristics of the cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–23.
- Evans, A. J. (2013). Characteristics of cone-forming cyanobacteria and implications for the origin of conical stromatolites [Massachusetts Institute of Technology].
- Fairbrother, R., & Williams, B. (1956). Two New Antibiotics. Antibacterial Activity of Novobiocin and Vancomycin. *Lancet*, 1177–1179.
- Ferris, M. J., & Hirsch, C. (1991). Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1448–1452.
- Flint, H. J., & Duncan, S. (2014). Bacteroides and prevotella. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 203–208). Elsevier Inc.
- Galperin, M. Y. (2016). Genome diversity of spore-forming Firmicutes. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, 1–18.
- Gan, F., & Bryant, D. A. (2015). Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3450–3465.
- Hartnell, D. M., Chapman, I. J., Esteban, G. F., & Franklin, D. J. (2016). Exploiting eco-physiological niche to facilitate the separation of the freshwater cyanobacteria *Microcystis* sp. and *Synechococcus* sp. *Journal of Microbiological Methods*, 122, 13–15.
- Hellinger, W. C., & Brewer, N. S. (1991). Imipenem. *Mayo Clinic Proceedings*, 66(10), 1074–1081.
- Hitch, T. C., Thomas, B. J., Friedersdorff, J. C., Ougham, H., & Creevey, C. J. (2018). Deep sequence analysis reveals the ovine rumen as a reservoir of antibiotic resistance genes. *Environmental Pollution*, 235, 571–575.
- Ho, M.-Y., & Bryant, D. A. (2019). Global transcriptional profiling of the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 in far-red light: Insights into the regulation of chlorophyll d synthesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 440197.
- Ho, M.-Y., & Bryant, D. A. (2021). Photosynthesis | Long Wavelength Pigments in Photosynthesis. In J. Jez (Ed.), *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (pp. 245–255). Elsevier.
- Hong, J. W., Choi, H.-G., Kang, S.-H., & Yoon, H.-S. (2010). Axenic purification and

- cultivation of an Arctic cyanobacterium, *Nodularia spumigena* KNUA005, with cold tolerance potential for sustainable production of algae-based biofuel. *Algae*, 25(2), 99–104.
- Ko, J. T., Li, Y. Y., Chen, P. Y., Liu, P. Y., & Ho, M. Y. (2024). Use of 16S rRNA gene sequences to identify cyanobacteria that can grow in far-red light. *Molecular Ecology Resources*, 24(1), e13871.
- Kohn, T., Rast, P., Kallscheuer, N., Wiegand, S., Boedeker, C., Jetten, M. S., Jeske, O., Vollmers, J., Kaster, A.-K., & Rohde, M. (2020). The microbiome of *Posidonia oceanica* seagrass leaves can be dominated by Planctomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1458.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621.
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., & Sauer, M. (2020). Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 556140.
- Peeters, S. H., Wiegand, S., Kallscheuer, N., Jogler, M., Heuer, A., Jetten, M. S. M., Rast, P., Boedeker, C., Rohde, M., & Jogler, C. (2020). Three marine strains constitute the novel genus and species *Crateriforma conspicua* in the phylum Planctomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 1797–1809.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(3), 183–209.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596.
- Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167, 3–27.
- Rizzatti, G., Lopetuso, L., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A common factor in human diseases. *BioMed Research International*, 2017.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Sutcliffe, I. C. (2010). A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends in Microbiology*, 18(10), 464–470.
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Benavides, A. M. S., & Torzillo, G. (2016). Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 100, 1333–1341.

Wiegand, S., Jogler, M., & Jogler, C. (2018). On the maverick Planctomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 739–760.

Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F. (2013). Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, 11(8), 2894–2916.

